Вавиловский журнал генетики и селекции. 2016;20(1):78-86
DOI 10.18699/VJ16.112

Моделирование генетических процессов формирования резистентности к фипронилу в популяциях колорадского жука (*Leptinotarsa decemlineata* Say)

К.А. Китаев[1], И.С. Марданшин[2], Е.В. Сурина[1], Т.Л. Леонтьева[3], М.Б. Удалов[1], Г.В. Беньковская[1]

[1] Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра Российской академии наук, Уфа, Россия
[2] Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Башкирский научно-исследовательский институт сельского хозяйства», Уфа, Россия
[3] Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования Башкирский государственный аграрный университет, Уфа, Россия

Основным способом контроля численности вредителей остается обработка химическими инсектицидами. Эффективность применения инсектицидов снижается из-за формирования резистентности в популяциях вредителей. Это особенно актуальная проблема при борьбе с колорадским жуком. Для замедления развития устойчивости к химическим препаратам предлагаются разные стратегии применения инсектицидов. На основе данных комплексного многолетнего исследования нами была предложена гипотеза замедления развития устойчивости за счет применения пониженных доз инсектицидов. Мы построили прогностическую дискретную генетическую модель развития устойчивости в популяциях колорадского жука для проверки нашей гипотезы. Модель, основанная на классических уравнениях популяционной генетики, была дополнена действием различных факторов. Расчеты коэффициентов выживаемости особей колорадского жука велись с учетом статистических закономерностей распределения дозы токсического вещества после обработок инсектицидами. Используя логнормальное распределение, мы рассчитали коэффициенты выживаемости разных генотипов при изменении дозы обработки инсектицидами в два и более раз. Дополнительно ввели в модель фактор дифференцированной смертности во время зимовки. Использование данных об изменении соотношения встречаемости фенетических маркеров неспецифической устойчивости к факторам среды позволило провести расчеты модели с опосредованными межгенными взаимодействиями. На данной модели были проверены различные гипотезы в разработке стратегии преодоления резистентности. Расчеты показали, что применение минимально эффективных доз инсектицидов (пониженных доз) приводит к замедлению увеличения доли резистентных особей в популяциях колорадского жука на пару сезонов. При чередовании применения инсектицидов из разных химических классов устойчивость развивается гораздо медленнее. Наиболее оптимальной стратегией являются межсезонное чередование применения инсектицидов разных химических классов и обработка пониженными дозами.

Ключевые слова: защита картофеля; резистентность к инсектицидам; пониженная доза инсектицида; фипронил; генетическое моделирование; популяция; колорадский жук; *Leptinotarsa decemlineata*.

Modeling of genetic processes underlying the development of resistance to fipronil in the Colorado potato beetle (*Leptinotarsa decemlineata* Say)

K.A. Kitaev[1], I.S. Mardanshin[2], E.V. Surina[1], T.L. Leontieva[3], M.B. Udalov[1], G.V. Benkovskaya[1]

[1] Institute of Biochemistry and Genetics USC RAS, Ufa, Russia
[2] Bashkirian Institute of Agriculture, Ufa, Russia
[3] Bashkir State Agrarian University, Ufa, Russia

The main method of pest control is by applying chemical insecticides. The efficacy of insecticides is reduced due to the development of resistance by pest populations. This is an especially important problem with the Colorado potato beetle. There are different strategies for the use of insecticides to slow the development of resistance. Based on long lasing research, we propose a hypothesis about delaying the development of resistance by applying insecticides at low doses. To test this hypothesis, we have built predictive discrete genetic models of resistance in Colorado potato beetle populations. The model based on the classical equations of population genetics has been supplemented by various factors. Calculations of the survival rates of Colorado potato beetle individuals were carried out taking into account the statistical regularities of the distribution of the toxic substance after treatment by insecticides. We have calculated the survival rates of different genotypes using a lognormal distribution after changing the insecticide dose two-fold or more. The factor of differentiated mortality during the winter was additionally introduced into the model. The use of phenetic markers of nonspecific resistance to environmental factors allowed us to compute the model with mediated intergenic interactions. Various hypotheses about strategies in overcoming resistance have been tested using this model. Calculations demonstrated that the use of insecticides at minimum effective doses (low dose) leads to a slower increase in the proportion of resistant individuals in populations of the Colorado potato beetle for two seasons. Resistance develops much more slowly

УДК 575.174.4:575.22:57.033:595.768.12
Поступила в редакцию 16.12.2014 г.
Принята к публикации 17.12.2015 г.
© АВТОРЫ, 2016

e-mail: cordek@ya.ru

following alternate treatment with insecticides from different chemical classes. The best strategy is through off-season treatment with insecticides of different chemical classes at lower doses.

Key words: protection of potato resistance against insecticides; insecticides at low doses; fipronil; genetic modeling; population; Colorado potato beetle; *Leptinotarsa decemlineata*.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Китаев К.А., Марданшин И.С., Сурина Е.В., Леонтьева Т.Л., Удалов М.Б., Беньковская Г.В. Моделирование генетических процессов формирования резистентности к фипронилу в популяциях колорадского жука (*Leptinotarsa decemlineata* Say). Вавиловский журнал генетики и селекции. 2016;20(1):78-86. DOI 10.18699/VJ16.112

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Kitaev K.A., Mardanshin I.S., Surina E.V., Leontieva T.L., Udalov M.B., Benkovskaya G.V. Modeling of genetic processes underlying the development of resistance to fipronil in the Colorado potato beetle (*Leptinotarsa decemlineata* Say). Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektsii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2016;20(1):78-86. DOI 10.18699/VJ16.112

Инсектициды остаются наиболее надежным средством контроля численности насекомых. Но эффективность их применения снижается из-за формирования резистентности (Stankovic et al., 2004; Рославцева, 2005, 2009; Сухорученко, 2005; Baker et al., 2007; Alyokhin et al., 2008; Беньковская и др., 2008а; Alyokhin, 2009; Benkovskaya et al., 2009). Имеющиеся в арсенале агрономов средства защиты картофеля от колорадского жука также потенциально могут стать факторами формирования новых резистентных популяций и утратить свои изначально ценные хозяйственные свойства (Сухорученко и др., 2006). Разработка стратегии применения пестицидов и других технологических факторов, препятствующих формированию резистентных популяций вредных организмов, является не только актуальной научной проблемой, но и важной задачей для бизнеса, направленной как на защиту капитальных вложений в создание препаратов или производство сельхозпродукции, так и на разрешение проблемы сохранения окружающей среды.

Предлагаются различные методы мониторинга развития резистентности, которые позволяют проводить анализ ее формирования в популяциях колорадского жука, хотя разработка мер по предотвращению развития устойчивости продолжает оставаться очень серьезной проблемой (Климец, 1988; Сухорученко и др., 1990, 2006; Zhu et al., 1996; Clark et al., 2001; Рославцева, 2005; Li et al., 2006; Рославцева, Диденко, 2010; Zichova et al., 2010; Удалов, Беньковская, 2010; Jiang et al., 2011).

Возникновение резистентных к инсектицидам популяций насекомых является следствием направленного отбора, действующего в агроценозах. Применяемые в агротехнологиях инсектициды выступают как селективные факторы отбора. Фенотипы, способные преодолевать действие инсектицидов, сохраняются отбором, тогда как неадаптивные элиминируются. Действие других факторов может как снижать выживаемость устойчивых особей, так и повышать ее.

Для решения проблемы формирования резистентности необходимо изучить закономерности этого процесса, влияние природных факторов среды и антропогенного воздействия на повышение или снижение уровня резистентности. По данным комплексного исследования можно построить прогностическую имитационную модель, основанную на взаимодействии различных факторов, с использованием которой можно будет взвешенно и обоснованно принимать решение о различных стратегиях замедления развития резистентности (Tabashnik, 1990; Argentine et al., 1994). Основной целью нашего исследования стала проверка гипотез о влиянии различных агротехнических приемов на ускорение или замедление развития резистентности в популяциях колорадского жука. Поскольку на них всегда действует комплекс факторов, необходимо иметь методы оценки воздействия каждого из факторов, а также их совокупности. Для решения этой проблемы необходим достаточно простой и в то же время универсальный математический аппарат, позволяющий изменять при прогнозировании набор условий и затем результаты расчетов экспериментально проверять и уточнять.

Материалы и методы

Для эксперимента по повышению устойчивости к инсектицидам в популяциях колорадского жука использовали препарат «Регент» в виде водно-диспергируемых гранул с содержанием 800,0 г/кг фипронила. Препарат применяется для опрыскивания картофеля в период вегетации. Фипронил воздействует на нервную систему насекомого, связываясь с аллостерическим сайтом рецептора гамма-аминомасляной кислоты (ГАМК) и блокируя работу хлор-ионного канала, что вызывает гибель вредителя (Narahashi et al., 2007). Норма расхода 0,020–0,025 л/га. Биологическая эффективность действия препарата в период интенсивного питания личинок колорадского жука в полевых условиях составляет 89–99 % (Долженко, 2009). Впервые «Регент» был зарегистрирован и начал применяться на территории Российской Федерации в 1998 г. Широкое применение данного препарата в Республике Башкортостан началось с 2003 г.

Устойчивость насекомых к фипронилу обусловлена наличием мутации в гене *Rdl*, кодирующем субъединицу рецептора ГАМК (Li et al., 2006). Резистентность к фипронилу наследуется рецессивно, но при низких дозах препарата частично проявляется и у гетерозигот (Sayyed, Wright, 2004).

На основе закона Харди–Вайнберга и формулы роста популяции Фишера предложены уравнения, описывающие процессы увеличения или уменьшения частоты аллельных генов при отборе в зависимости от времени (формулы 1–3) (Алтухов и др., 2004).

$$p_{n+1} = \frac{W_1 \cdot p_n^2 + W_2 \cdot p_n \cdot q_n}{W}, \quad (1)$$

$$q_{n+1} = \frac{W_3 \cdot q_n^2 + W_2 \cdot p_n \cdot q_n}{W}, \quad (2)$$

$$W = W_1 \cdot p_n^2 + W_2 \cdot p_n \cdot q_n + W_3 \cdot q^2, \quad (3)$$

где p и q – частоты аллельных генотипов, в сумме составляющие 1; W – средняя приспособленность, W_1, W_2, W_3 – коэффициенты приспособленности (выживаемости) соответствующих генотипов.

Коэффициент приспособленности каждого генотипа (n) представляет собой сложную функцию $W_n(r, N, K, D, w)$. Основные параметры этой функции: r – плодовитость, N – общая численность, K – емкость среды, D – естественная смертность, w – относительная приспособленность (отношение выживаемости данного генотипа к выживаемости генотипа с максимальным ее значением). В нашем исследовании мы допускаем, что первые четыре параметра не меняются в пределах популяции (r, N, K, D = const), следовательно, в модели их можно не учитывать. Значение параметра w для вариантов гена *Rdl* в популяциях колорадского жука в основном определяется устойчивостью к инсектицидам – R (т. е. $w = R$). Дополнительно рассматриваются следующие параметры: относительная выживаемость в период зимовки (S), влияние неспецифических факторов устойчивости и адаптивности (M). Для удобства мы рассчитывали все параметры в виде коэффициентов, на которые умножали относительную приспособленность w.

Для расчета коэффициентов приспособленности использовали две группы данных. Одни были получены при исследовании увеличения доли резистентных особей колорадского жука на картофельной плантации площадью 30 га в опытно-производственном хозяйстве Бирское Башкирского НИИСХ РАСХН (табл. 1) с применением пониженных доз инсектицида (уменьшение в 2–2,5 раза от рекомендуемой дозы, до 0,01 л/га). Другие собраны при исследовании выборок из различных районов Республики Башкортостан (Марданшин и др., 2012). Оценку доли резистентных имаго в популяциях колорадского жука проводили методом топикального нанесения диагностической дозы препарата (Сухорученко и др., 2006) в виде 1 мкл/особь раствора концентрации 0,001 %-го действующего вещества, которая является удвоенной ЛК95 для колорадского жука.

Результаты и обсуждение

Динамика развития резистентности к инсектициду «Регент» в ОПХ Бирское представлена в табл. 1.

Обозначим s – чувствительный аллель, а r – резистентный. R – устойчивость к инсектицидам, определяемая как доля носителей генотипа, выживающих после обработки. Поскольку резистентность к фипронилу обеспечивается аллелем, который при больших дозах проявляется рецессивно, а при меньших частично рецессивно (Sayyed, Wright, 2004), будем считать, что при действии диагностической дозы инсектицида особь с генотипом ss – является полностью чувствительной ($R_1 = 0$), rs – частично резистентной ($R_2 \sim 0{,}5$) и rr – абсолютно нечувствительной, резистентной ($R_3 = 1$). Исходя из этого, примем, что в опытах по оценке доли резистентных особей в выборках выживают примерно половина гетерозигот и все гомозиготы по резистентному аллелю.

Величина порога чувствительности к инсектициду является полиморфным признаком. Кривые зависимости выживаемости особей разных генотипов от концентрации инсектицида представлены на рис. 1, *а*. В агроценозах доза инсектицида, получаемая индивидуальной особью, заметно варьирует, являясь величиной, зависящей от множества факторов и, следовательно, распределенной случайно. Поскольку доза инсектицида не должна быть отрицательной и с течением времени при питании колорадского жука она может значительно увеличиваться, плотность вероятности накопления определенной дозы должна подчиняться функции логнормального распределения (Безель и др., 1994) (рис. 1, *б*), где x – концентрация, а μ и σ – параметры распределения. Кривая распределения смещена влево (рис. 1, *б*) (Лакин, 1990). Умножая вероятность выживаемости на вероятность получения определенной дозы, получим кривую выживаемости особей после обработки в полевых условиях. Площадь под получившейся кривой является долей выживших особей (устойчивость к инсектициду в полевых условиях – R') (рис. 1, *в*). Так как в исходных (чувствительных) популяциях биологическая эффективность фипронила (смертность от инсектицида в агроценозе) составляет 89–99 %, можно рассчитать среднее значение устойчивости для чувствительных генотипов и гетерозигот:

$$f(x) = \frac{1}{x \cdot \sigma \cdot \sqrt{2\pi}} e^{\frac{(-(\ln(x) - \mu)^2)}{2\sigma^2}}. \quad (4)$$

При использовании небольших интервалов изменения концентрации инсектицида ($0{,}5 \times 10^{-7}$) рассчитывали функцию распределения (рис. 1, *б*) и умножали значения для каждой точки на возможную смертность (рис. 1, *а*). Определив площадь под кривыми результирующих значений (рис. 1, *в*) методом трапеций, получили в случае применения рекомендованной дозы инсектицида «Регент» следующие значения $R'_1 = 0{,}06$; $R'_2 = 0{,}20$; $R'_3 = 1$. При применении пониженных доз инсектицида максимум распределения вероятности получения определенной дозы смещается влево (рис. 1, *б*, кривая *2*), доля выживших особей увеличивается и биологическая эффективность составляет 82–93 %. Значения устойчивости для разных генотипов в этом случае таковы: $R''_1 = 0{,}125$; $R''_2 = 0{,}35$; $R''_3 = 1$.

Резистентность к препарату «Регент» в популяциях колорадского жука обнаруживается в разных районах Республики Башкортостан. С 2006 по 2010 гг. доля выборок с устойчивыми особями в стране увеличилась от 13 до 100 %, и средняя доля устойчивых особей в последние годы колеблется от 5 до 10 % (Марданшин и др., 2012). Возможно, что генетическую основу резистентности составляют аллели, которые изначально существуют в популяциях колорадского жука, но не дают каких-либо преимуществ их носителям, являясь генетическим грузом популяции. При построении генетической модели мы взяли в качестве начального значения доли гетерозигот ~ 1 %, что дает нам соотношение частот генов в популяции: 99,5 % для чувствительного аллеля и 0,5 % для резистентного аллеля. Расчетное повышение доли

Таблица 1. Изменение доли устойчивых к препарату «Регент» особей колорадского жука по мере использования препарата (Марданшин и др., 2012, с дополнениями)

Год	Выборка	Доля устойчивых особей
2007	Перезимовавшие	0,000
2008	Перезимовавшие	0,000
2009	Летняя генерация	0,100 ± 0,019
2010	Перезимовавшие	0,050 ± 0,003
	Летняя генерация	0,250 ± 0,050
2011	Перезимовавшие	0,200 ± 0,060

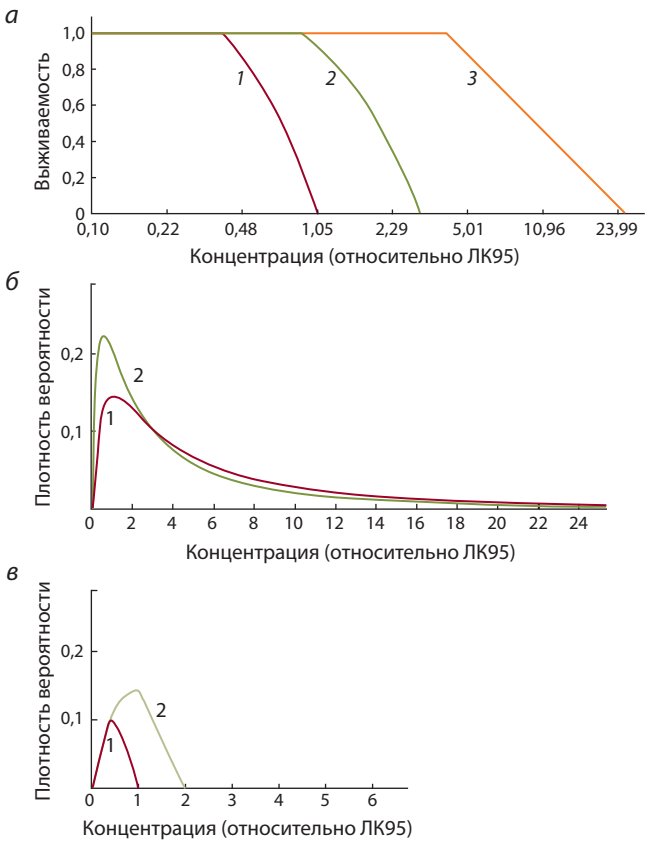

Рис. 1. Выживаемость в выборках колорадского жука в зависимости от дозы инсектицида (определяется концентрацией препарата при обработке) с учетом логнормального распределения вероятности накопления определенной дозы.

а – кривые вероятности выживаемости в зависимости от концентрации фипронила для разных генотипов (*1* – чувствительные к инсектициду, *2* – гетерозиготные, *3* – резистентные к инсектициду) (Sayyed, Wright, 2004); *б* – кривые плотности вероятности накопления определенной дозы инсектицида (*1* – при рекомендуемой дозе обработки, *2* – при пониженной дозе обработки); *в* – расчетные кривые выживаемости особей при обработке инсектицидом в поле (*1* – чувствительные гомозиготы, *2* – гетерозиготы), площадь под этими кривыми составляет долю выживших особей.

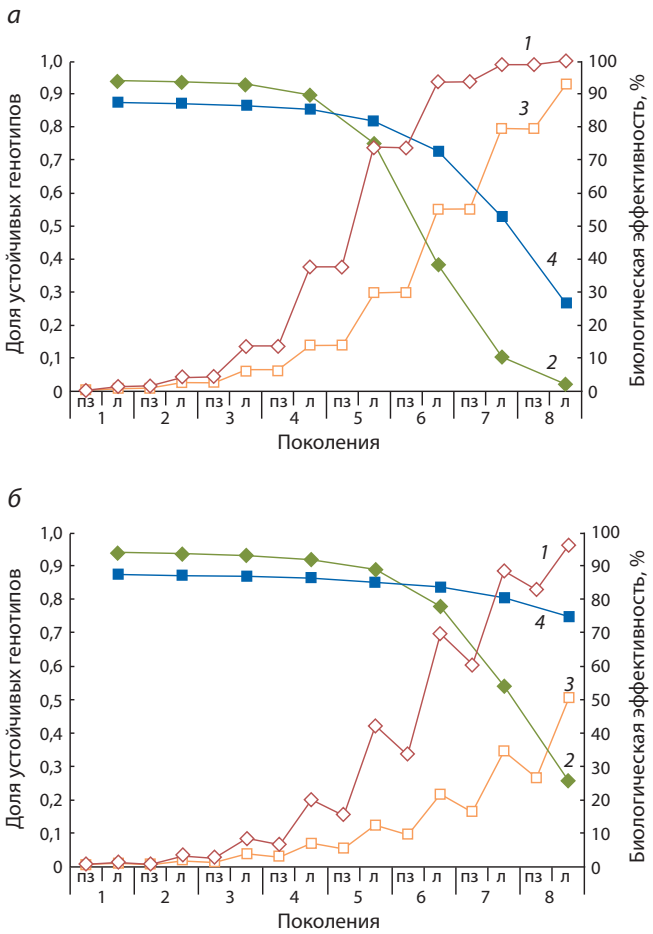

Рис. 2. Результаты расчетов модели развития резистентности и снижения биологической эффективности при разных дозах препарата «Регент».

а – для модели без учета смертности во время зимовки; *б* – для модели с учетом этой смертности. Доля резистентных особей и изменение биологической эффективности при использовании рекомендованной дозы препарата обозначены (*1*) и (*2*), а при использовании пониженной дозы препарата – (*3*) и (*4*) соответственно; пз – перезимовавшие; л – летнее поколение.

резистентных генотипов и снижение биологической эффективности в течение ряда сезонов с одной обработкой показано на рис. 2, *а*. Видно, что резистентность возрастает очень быстро, такое изменение не наблюдается на практике (табл. 1).

В опыте, проведенном в Бирском ОПХ, отмечено выраженное понижение доли устойчивых у перезимовавших особей по сравнению с выборками из летней генерации (см. табл. 1). Чтобы охарактеризовать изменение частот генотипов, мы ввели и рассчитали дополнительный пара-

метр S – изменение доли генотипа *ss* в результате зимовки. Значение параметра S составило в 2010 г. 0,47, а в 2011 г. – 0,75. Этот показатель сильно варьирует в зависимости от условий зимовки. Усредняя, примем в расчетах, что при выходе из зимней диапаузы доля выживших составляет 0,7 для гетерозигот и 0,4 для гомозигот. Расчеты накопления доли устойчивых генотипов с учетом смертности имаго во время зимней диапаузы представлены на рис. 2, *б*. Применение пониженных доз инсектицида дает небольшое преимущество, теоретически при этом развитие резистентности отстает на одно–два поколения, такое же преимущество показано в опыте (Марданшин и др., 2012).

График на рис. 2, *б* близок к наблюдаемым изменениям резистентности, но со временем расхождения с опытными данными увеличиваются. Для уточнения и получения более полного соответствия рассчитанной доли устойчивых особей значениям, полученным в опыте, мы решили рассмотреть наличие неспецифических механизмов устойчивости.

Неспецифические системы защиты могут менять направление отбора резистентных генотипов, ослабляя воздействие инсектицидов, снижая эффекты патогенеза и других неблагоприятных факторов и в итоге повышая вероятность удачной зимовки. Одним из маркеров действия неспецифических механизмов устойчивости являются системы, связанные с метаболизмом тирозина и биосинтезом меланина. Эти системы участвуют в различных защитных реакциях насекомых – иммунных, стрессовых – и, по-видимому, вносят вклад в формирование устойчивости к некоторым инсектицидам. Показано, что при многократном действии инсектицидов на популяции колорадского жука наблюдается избирательное выживание фенотипов с низкой меланизацией и повышенной плотностью покровов (Беньковская, 2006, 2009; Беньковская и др., 2008б; Zhang et al., 2008). У колорадского жука выделяются три морфотипа по степени меланизации кутикулы: ахромист, меланист и промежуточный тип (Беньковская и др., 2004; Беньковская, 2006, 2009).

Инсектицидный пресс влияет на фенотипическую структуру популяций колорадского жука, приводя к избирательному сокращению частот встречаемости некоторых вариаций фенов рисунка покровов (Климец, 1988; Беньковская и др., 2008б; Удалов, Беньковская, 2010; Benkovskaya, Udalov, 2011).

В наших экспериментах связь отдельных фенов или целостных морфотипов с устойчивостью к фипронилу не выявляется. Среди особей колорадского жука, выживающих после обработки препаратом в диагностической концентрации, соотношение фенотипов меняется стохастически. Однако с 2007 по 2010 гг. в исследуемых агроценозах при постоянном применении препарата «Регент» возросла доля ахромистов (с 0,08 до 0,24) и особей промежуточного типа (с 0,56 до 0,64), в то время как доля меланистов уменьшилась (с 0,36 до 0,12). Это указывает на возможность влияния механизмов, связанных с меланизацией, на смертность устойчивых к фипронилу особей под действием других факторов среды.

Генетический контроль, определяющий проявление морфотипов, включает множество генов, но у колорадского жука частоты встречаемости морфотипов проявляют менделевское расщепление с неполным доминированием (Беньковская, 2006, 2009; Беньковская и др., 2008б). По-видимому, ахромисты и меланисты являются гомозиготами (*AA* и *MM* соответственно), а промежуточный тип – гетерозиготами (*AM*). Соотношение морфотипов меняется в течение сезона, поскольку оно зависит от различных факторов среды, но в течение длительных промежутков времени их соотношение должно быть относительно стабильно.

Влияние морфотипа на сохранность генотипов с устойчивостью к фипронилу в различных условиях среды еще недостаточно изучено, и требуются новые исследования. Однако возникает и встречный вопрос – о влиянии доли устойчивых генотипов на соотношение морфотипов, приводящем к увеличению доли ахромистов. Для его выяснения мы введем в рассматриваемую генетическую модель наличие у колорадского жука двух несцепленных генов и, соответственно, девять возможных генотипов (табл. 2). В модель вместо параметра S введем параметр выживаемости M, зависящий от морфотипа и чувствительности к инсектициду.

По нашим наблюдениям, ахромисты лучше, чем меланисты, переживают пониженные температуры и зимовку, раньше выходят из почвы, поэтому нами было сделано предположение, что относительная выживаемость резистентных генотипов в период зимовки в основном зависит от количества ахромистов. Для точного определения этого параметра для каждого генотипа требуются многолетние исследования, но мы ограничимся данными за три года (2007–2010 гг.). Изменяя разные коэффициенты в модели, нашли параметры, которые обеспечивают корректное изменение соотношения морфотипов в популяции, сопряженное с ростом резистентности. Полученный параметр M для ахромистов (*AAss*, *AAsr* и *AArr*) равен 1 независимо от чувствительности к инсектициду $M_1 = M_2 = M_3 = 1$, для относящихся к промежуточному типу чувствительных к инсектициду гомозигот (*AMss*) $M_4 = 1$ и гетерозигот (*AMsr*) $M_5 = 0{,}8$, а для резистентных гомозигот (*AMrr*) равен $M_6 = 0{,}5$; для меланистов чувствительных гомозигот (*MMss*) равен $M_7 = 1$, а для остальных соответственно $M_8 = 0{,}5$ и $M_9 = 0{,}4$. В случае с высокой устойчивостью к фипронилу параметр R не зависит от морфотипа. Для получения общего параметра w для каждого генотипа перемножим соответствующие R и M. Графики накопления доли устойчивых особей представлены на рис. 3. По мере увеличения доли ахромистов происходит ускорение развития резистентности. Примерно так же развивается резистентность в экспериментальной популяции колорадского жука (см. табл. 1).

На графиках (*1*) и (*3*) рис. 3 видно, как происходит нарастание доли резистентных особей, с постепенным увеличением разрыва между вариантами с разной дозой инсектицида (рекомендованной и пониженной), при этом биологическая эффективность значительно быстрее уменьшается в варианте с рекомендованной дозой. Это еще раз подтверждает вывод о полезности снижения действующей дозы инсектицида до минимально приемлемого уровня биологической эффективности (Марданшин и др., 2012). Применение этого метода вполне оправданно, но наблюдаемое отставание составляет только пару сезонов.

Таблица 2. Генотипы и расчет модели с двумя несцепленными генами

Генотипы и их доли		Доля генотипа	
		в летней генерации	после зимовки
AAss	k^2p^2	$k^2p^2 \cdot \mathbf{R_1}$	$k^2p^2 \cdot \mathbf{R_1} \cdot \mathbf{M_1}$
AAsr	$k^2 2pq$	$k^2 2pq \cdot \mathbf{R_2}$	$k^2 2pq \cdot \mathbf{R_2} \cdot \mathbf{M_2}$
AArr	k^2q^2	$k^2q^2 \cdot \mathbf{R_3}$	$k^2q^2 \cdot \mathbf{R_3} \cdot \mathbf{M_3}$
AMss	$2klp^2$	$2klp^2 \cdot \mathbf{R_1}$	$2klp^2 \cdot \mathbf{R_1} \cdot \mathbf{M_4}$
AMsr	$2kl2pq$	$2kl2pq \cdot \mathbf{R_2}$	$2kl2pq \cdot \mathbf{R_2} \cdot \mathbf{M_5}$
AMrr	$2klq^2$	$2klq^2 \cdot \mathbf{R_3}$	$2klq^2 \cdot \mathbf{R_3} \cdot \mathbf{M_6}$
MMss	l^2p^2	$l^2p^2 \cdot \mathbf{R_1}$	$l^2p^2 \cdot \mathbf{R_1} \cdot \mathbf{M_7}$
MMsr	$l^2 2pq$	$l^2 2pq \cdot \mathbf{R_2}$	$l^2 2pq \cdot \mathbf{R_2} \cdot \mathbf{M_8}$
MMrr	l^2q^2	$l^2q^2 \cdot \mathbf{R_3}$	$l^2q^2 \cdot \mathbf{R_3} \cdot \mathbf{M_9}$
w среднее		Сумма долей генотипов	
Аллели и их доли			
A	k	$(k^2p^2 \cdot \mathbf{R_1} \cdot \mathbf{M_1} k + k^2 2pq \cdot \mathbf{R_2} \cdot \mathbf{M_2} + k^2q^2 \cdot \mathbf{R_3} \cdot \mathbf{M_3} + klp^2 \cdot \mathbf{R_1} \cdot \mathbf{M_4} + kl2pq \cdot \mathbf{R_2} \cdot \mathbf{M_5} + klq^2 \cdot \mathbf{R_3} \cdot \mathbf{M_6})/\mathbf{w}$	
M	l	$(l^2p^2 \cdot \mathbf{R_1} \cdot \mathbf{M_7} + l^2 2pq \cdot \mathbf{R_2} \cdot \mathbf{M_8} + l^2q^2 \cdot \mathbf{R_3} \cdot \mathbf{M_9} + klp^2 \cdot \mathbf{R_1} \cdot \mathbf{M_4} + kl2pq \cdot \mathbf{R_2} \cdot \mathbf{M_5} + klq^2 \cdot \mathbf{R_3} \cdot \mathbf{M_6})/\mathbf{w}$	
S	p	$(k^2p^2 \cdot \mathbf{R_1} \cdot \mathbf{M_1} + k^2pq \cdot \mathbf{R_2} \cdot \mathbf{M_2} + 2klp^2 \cdot \mathbf{R_1} \cdot \mathbf{M_4} + 2klpq \cdot \mathbf{R_2} \cdot \mathbf{M_5} + l^2p^2 \cdot \mathbf{R_1} \cdot \mathbf{M_7} + l^2pq \cdot \mathbf{R_2} \cdot \mathbf{M_8})/\mathbf{w}$	
R	q	$(k^2q^2 \cdot \mathbf{R_3} \cdot \mathbf{M_3} + k^2pq \cdot \mathbf{R_2} \cdot \mathbf{M_2} + 2klq^2 \cdot \mathbf{R_3} \cdot \mathbf{M_6} + 2klpq \cdot \mathbf{R_2} \cdot \mathbf{M_5} + l^2q^2 \cdot \mathbf{R_3} \cdot \mathbf{M_9} + l^2pq \cdot \mathbf{R_2} \cdot \mathbf{M_8})/\mathbf{w}$	

Доля перезимовавших высчитывается относительно доли летних прошлого года, доля летних – из доли аллелей и выживаемости после обработок инсектицидом.

Даже замедленное формирование резистентности приводит к быстрому снижению биологической эффективности обработок, что можно предотвратить только при смене препарата.

Для уточнения возможностей дальнейшего снижения дозы инсектицида мы провели вычислительный эксперимент. Снижение дозы приведет к повышению параметров R_1 и R_2. Для вычислений взяли ряды из нарастающих значений этих параметров R_1 (0,06; 0,125; 0,15; 0,175; 0,20; 0,225) и соответствующие R_2 (0,18; 0,29; 0,32; 0,36; 0,39; 0,42), рассчитанные по смещению теоретического распределения инсектицидов при обработке. R_3 оставляли неизменным. Вычисленные изменения биологической эффективности представлены на графиках рис. 4. Здесь заметен бóльший разрыв между начальными вариантами, разница между следующими значениями уменьшается и практически не заметна. Наибольшее замедление снижения биологической эффективности дают варианты с R_1 в диапазоне 0,125–0,15, что соответствует предлагаемому снижению дозы инсектицида (в два–три раза от рекомендуемых значений).

На рис. 5 показано изменение соотношения морфотипов в популяции колорадского жука, полученное при расчете модели с двумя несцепленными генами. В созданной модели происходит постепенное увеличение доли ахромистов, которое не наблюдается в природных условиях, следовательно, можно предположить, что неучтенные в модели факторы могут достаточно сильно влиять на изменение соотношения морфотипов. Одним из таких факторов могут являться природные патогены, в частности, энтомопатогенные грибы, обнаруженные в популяциях колорадского жука (Крюков и др., 2007а, б; Сурина, Беньковская, 2009, 2010; Сурина и др., 2013; Surina et al., 2013). Меланисты имеют большую устойчивость к заражению энтомопатогенными грибами за счет повышенного уровня биосинтеза меланина, который участвует

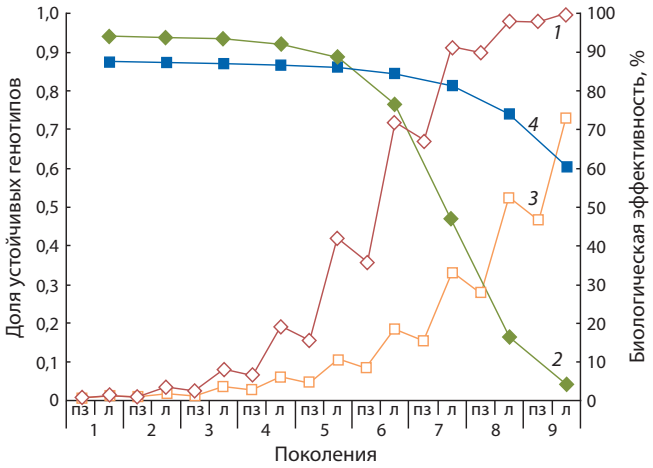

Рис. 3. Результаты расчетов модели развития резистентности и снижения биологической эффективности при разных дозах препарата «Регент», полученные при расчете дискретной модели для пары взаимодействующих генов.

Доля резистентных особей и изменение биологической эффективности при использовании рекомендованной дозы препарата представлена графиками (*1*) и (*2*), а при использовании пониженной дозы препарата – (*3*) и (*4*) соответственно; пз – перезимовавшие; л – летнее поколение.

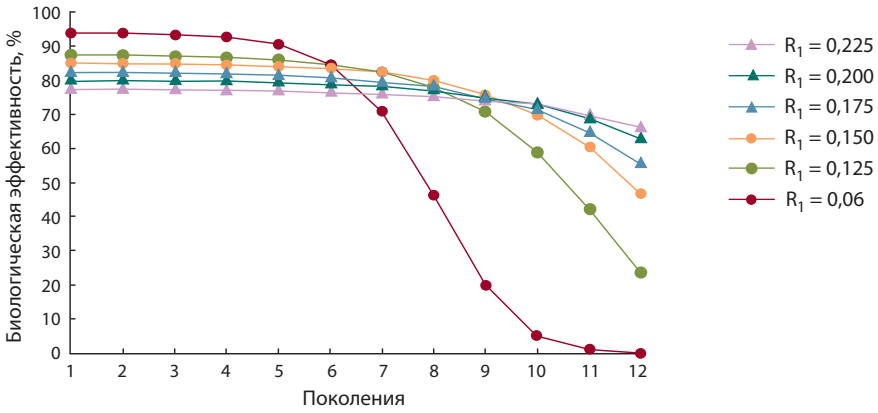

Рис. 4. Снижение биологической эффективности, полученное при расчете генетической модели с разными показателями выживаемости чувствительных особей после обработки инсектицидом (R_1), меняющимися в зависимости от воздействующей дозы.

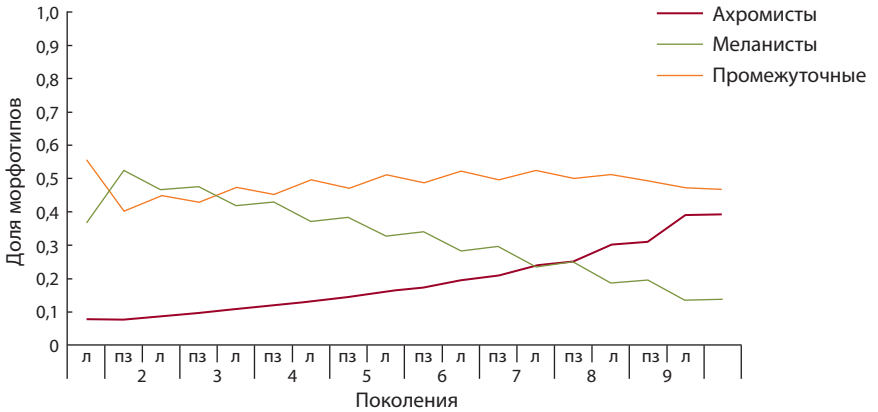

Рис. 5. Изменение соотношения морфотипов в популяции колорадского жука под действием пониженных доз инсектицида «Регент».

пз – перезимовавшие, л – летнее поколение.

в процессе инкапсуляции гиф гриба, проникающего под кутикулу, и снижении эффекта интоксикации (Глупов и др., 2001; Дубовский и др., 2010). Возможно, ахромисты являются менее устойчивыми к заражению микопатогенами, и когда уровень зараженности в популяции возрастает, доля ахромистов может снижаться, при этом уменьшается и доля резистентных особей.

Дополнительно мы провели еще несколько вычислительных экспериментов с разными вариантами модели, добавив ген, мутация в котором определяет резистентность к инсектициду другого класса. При использовании двух инсектицидов одновременно даже при низких дозах удается достичь высокого значения биологической эффективности, но через 9–10 сезонов она начинает быстро снижаться. К тому же высока вероятность развития перекрестной устойчивости путем отбора мутаций в других генах, менее специфичных по действию. Чередование по годам двух инсектицидов разных классов в пониженных дозах позволяет поддерживать высокое значение биологической эффективности в течение 15–16 лет. Опасность развития перекрестной устойчивости сохраняется, но ее можно снизить применением инсектицидов из новых химических классов, до этого не применявшихся.

Привлечение различных данных о состоянии популяций колорадского жука позволяет рассчитать основные параметры изменения соотношения адаптивных и неадаптивных генотипов. Для получения точных значений параметров необходимо проводить мониторинг в популяциях колорадского жука по нескольким направлениям:

1) токсикологические исследования, выявляющие долю резистентных особей в популяции;
2) генетические исследования для определения соотношения адаптивных и неадаптивных генотипов, в том числе и с применением фенетического анализа;
3) мониторинг уровня зараженности энтомопатогенами для определения возможности естественного снижения резистентности.

Выполнение этих работ позволяет использовать математическое моделирование генетических процессов для прогнозирования и управления формированием резистентности в популяциях вредителя.

Модель, учитывающая две пары генов, достаточно точно отражает процессы, происходящие в популяции колорадского жука при ежегодной обработке препаратом «Регент» (фипронил). При определенной модификации значений отдельных параметров устойчивости можно применять эту модель в исследовании развития устойчивости к другим инсектицидам. В данной модели предполагается, что резистентность к инсектицидам определяется одним локусом, что наиболее часто наблюдается, хотя сейчас известно, что резистентность к некоторым инсектицидам определяется мутациями в нескольких генах. Неспецифические механизмы можно рассматривать обобщенно, по изменению соотношения морфотипов. Возможно применение и других маркеров устойчивости: биохимических или молекулярно-генетических. Модель позволяет оценить скорость стабилизации генетических процессов в популяциях колорадского жука, которые приводят к формированию резистентности к инсектицидам. Она предсказывает возможность замедления этих процессов, которая подтверждена на практике. Поведение модели позволяет проводить оценку гипотез о состоянии популяций колорадского жука, их адаптивности и лабильности относительно основных факторов отбора, а также проверять те или иные предположения о применимости различных методов замедления формирования резистентности.

Прогнозы генетической модели подтверждают эффективность предложенного нами ранее метода снижения применяемых доз инсектицидов для замедления роста устойчивости (Марданшин и др., 2012). Необходимо продолжить исследование этого метода в производственных условиях для получения дополнительных опытных данных. Биологическая эффективность инсектицида в отношении колорадского жука на уровне 80–87 % является вполне приемлемой при производстве картофеля, дальнейшее снижение дозы станет менее эффективным и, соответственно, экономически невыгодным. Также возможным способом сохранения биологической эффективности может быть чередование инсектицидов разных классов в течение ряда лет. При вводе в хозяйственный оборот инсектицидов новых классов следует применять пониженные дозы для поддержания их биологической эффективности и торможения развития резистентности в популяциях колорадского жука. Для этого необходимо акцентировать внимание на определении минимальных эффективных доз препаратов.

Благодарности

Работа выполнена в рамках проектов, поддержанных Российским фондом фундаментальных исследований (гранты № 11-04-1886-а, 11-04-97022-р_поволжье_а и 12-04-01450-а).

Авторы будут благодарны всем коллегам за возможность получить образцы колорадского жука из различных частей его ареала.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список литературы

Алтухов Ю.П., Салменкова Е.А., Курбатова О.Л., Политов Д.В., Евсюков А.Н., Жукова О.В., Захаров И.А., Моисеева И.Г., Столповский Ю.А., Пухальский В.А., Поморцев А.А., Упелниек В.П., Калабушкин Б.А. Динамика популяционных генофондов при антропогенных воздействиях. М.: Наука, 2004.

Безель В.С., Большаков В.Н., Воробейчик Е.Л. Популяционная экотоксикология. М.: Наука, 1994.

Беньковская Г.В. Дифференциация жизненных стратегий и фенотипы имаго *Leptinotarsa decemlineata* Say. Особь и популяция. Матер. IX Всерос. популяционного семинара. Уфа, 2006;1:23-28.

Беньковская Г.В. Эколого-физиологические характеристики и полиморфизм имаго колорадского жука на территории Башкортостана. Науч. ведомости БелГУ. Сер. естественные науки. 2009; 3(8):56-67.

Беньковская Г.В., Леонтьева Т.Л., Удалов М.Б. Резистентность колорадского жука к инсектицидам на Южном Урале. Агрохимия. 2008а;8:55-59.

Беньковская Г.В., Удалов М.Б., Поскряков А.В., Николенко А.Г. Феногенетический полиморфизм колорадского жука *Leptinotarsa decemlineata* Say как показатель его резистентности к инсектицидам. Агрохимия. 2004;12:1-6.

Беньковская Г.В., Удалов М.Б., Хуснутдинова Э.К. Генетическая основа и фенотипические проявления резистентности колорадского жука к фосфорорганическим инсектицидам. Генетика. 2008б;44(5):638–644.

Глупов В.В., Бахвалов С.А., Соколова Ю.Я. Внутренние защитные системы насекомых. Патогены насекомых: структурные и функциональные аспекты. Под ред. В.В. Глупова. М.: Круглый год, 2001.

Долженко В.И. Совершенствование ассортимента инсектицидов и технологий их применения для защиты картофеля от вредителей. Агрохимия. 2009;4:43-54.

Дубовский И.М., Крюков В.Ю., Беньковская Г.В., Ярославцева О.Н., Сурина Е.В., Глупов В.В. Активность ферментов детоксицирующей системы и интенсивность инкапсуляции у личинок колорадского жука *Leptinotarsa decemlineata* (Say) при воздействии фосфорорганического инсектицида и энтомопатогенного гриба *Metharizium anisopliae* (Metsch.). Евраз. энтомол. журнал. 2010;9(4):577-582.

Климец Е.П. Выявление чувствительности колорадского жука к действию инсектицидов с помощью фенов. Фенетика природных популяций. М., 1988.

Крюков В.Ю., Леднев Г.Р., Дубовский И.М., Серебров В.В., Левченко М.В., Ходырев В.П., Сагитов А.О., Глупов В.В. Перспективы применения энтомопатогенных гифомицетов (Deuteromycota, Hyphomycetes) для регуляции численности насекомых. Евраз. энтомол. журнал. 2007а;6(2):195-204.

Крюков В.Ю., Серебров В.В., Малярчук А.А., Копжасаров Б.П., Мухамадиев Н.С., Орынбаева А.К., Ходырев В.П. Перспективы использования энтомопатогенных гифомицетов (Deuteromycota, Hyphomycetes) против колорадского жука в условиях Юго-Восточного Казахстана. Сиб. вестник с.-х. науки. 2007б;4:52-60.

Лакин Г.Ф. Биометрия. М.: Высш. шк., 1990.

Марданшин И.С., Беньковская Г.В., Китаев К.А., Сурина Е.В., Леонтьева Т.Л., Удалов М.Б. Как замедлить процесс возникновения резистентности у колорадского жука к препарату Регент. Защита и карантин растений. 2012;5:14-15.

Рославцева С.А. Мониторинг резистентности колорадского жука к инсектицидам. Агрохимия. 2005;2:61-66.

Рославцева С.А. Резистентность к инсектицидам в популяциях колорадского жука. Агрохимия. 2009;1:87-92.

Рославцева С.А., Диденко Л.Н. Исследования популяций колорадского жука. Агрохимия. 2010;4:80-85.

Сурина Е.В., Беньковская Г.В. Микозы в популяциях *Leptinotarsa decemlineata* Say на территории РБ. Матер. Всерос. науч.-практ. конф. с междунар. участием «Экология, эволюция и систематика животных». Рязань, 2009.

Сурина Е.В., Беньковская Г.В. Некоторые аспекты коадаптации энтомопатогенных грибов и колорадского жука на Южном Урале. В мире научных открытий. 2010;4(1):61-64.

Сурина Е.В., Удалов М.Б., Беньковская Г.В. Популяционно-генетические аспекты восприимчивости колорадского жука к микозам на территории Республики Башкортостан. Экология. 2013;3: 204-209.

Сухорученко Г.И. Положение с резистентностью вредных видов в растениеводстве России в начале XXI века. Матер. II Всерос. съезда по защите растений. СПб., 2005.

Сухорученко Г.И., Долженко В.И., Гончаров Н.Р., Васильева Т.И., Иванов С.Г., Иванова Г.П., Тайманов Ш.И., Зенькевич С.В., Зверев А.А., Белых Е.Б. Технология и методы оценки побочных эффектов от пестицидов. СПб.: ВИЗР, 2006.

Сухорученко Г.И., Зильберминц И.В., Кузьмичев А.А. Определение резистентности вредителей сельскохозяйственных культур и зоофагов к пестицидам. М.: ВАСХНИЛ, 1990.

Удалов М.Б., Беньковская Г.В. Изменения уровня полиморфизма в популяциях колорадского жука на Южном Урале. Экол. генетика. 2010;8(3):61-66.

Alyokhin A., Baker M., Mota-Sanchez D., Dively G., Grafius E. Colorado potato beetle resistance to insecticides. Am. J. Potato Res. 2008;85:395-413.

Alyokhin A. Colorado potato beetle management on potatoes: current challenges and future prospects. Fruit, Vegetable and Cereal Sci. and Biotech. 2009;3(1):10-19.

Argentine J.A., Clark M.J., Ferro D.N. Computer simulation of insecticide resistance management strategies for control of Colorado potato beetle (Coleoptera: Chrysomelidae). J. Agric. Enlomol. 1994; 11(2):137-155.

Baker M.B., Alyokhin A., Porter A.H., Ferro D.N., Dastur S.R., Galal N. Persistence and inheritance of costs of resistance to imidacloprid in Colorado potato beetle. J. Eco. Entomol. 2007;100:1871-1879.

Benkovskaya G.V., Leontieva T.L., Udalov M.B. Colorado beetle resistance to insecticides in South Urals. Res. Pest Man. News. 2009; 19(1):3-4.

Benkovskaya G.V., Udalov M.B. Colorado Potato Beetles Investigations in the South Urals. N.Y.: Nova Science Publ., 2011.

Clark J.M., Lee S.H., Kim H.J., Yoon K.S., Zhang A. DNA-based genotyping techniques for the detection of point mutation associated with insecticide resistance in Colorado potato beetle *Leptinotarsa decemlineata.* Pest Man. Sci. 2001;57:968-974.

Jiang W.H., Guo W.C., Lu W.P., Shi X.Q., Xionga M.H., Wanga Z.T., Li G.Q. Target site insensitivity mutations in the ACHE and LD-Vssc1 confer resistance to pyrethroids and carbamates in *Leptinotarsa decemlineata* in Northern Xinjiang Uygur autonomous region. Pes. Biochem. Physiol. 2011;100(1):74-81.

Li A., Yang Y., Wu S., Li C., Wu Y. Investigation of resistance mechanisms to fipronil in diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae). J. Ecol. Entomol. 2006;99(3):914-919.

Narahashi T., Zhao X., Ikeda T., Nagata K., Yeh J.Z. Differential actions of insecticides on target sites: basis for selective toxicity. Hum. Exp. Toxicol. 2007;26(4):361-366.

Sayyed A.H., Wright D.J. Fipronil resistance in the diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae): Inheritance and number of genes involved. J. Ecol. Entomol. 2004;97(6):2043-2050.

Surina E.V., Udalov M.B., Benkovskaya G.V. Population genetic aspects of susceptibility of the Colorado potato beetle to mycopathogens in the Republic of Bashkortostan. Rus. J. Ecology. 2013;44(3): 227-232.

Stankovic S., Zabel A., Kostic M., Manojlovic B., Rajkovic S. Colorado potato beetle (*Leptinotarsa decemlineata* Say) resistance to organophosphates and carbamates in Serbia. J. Pest. Sci. 2004;77: 11-15.

Tabashnik B.E. Modeling and evaluation of resistance management tactics. Pesticide Resistance in Arthropods. Ed. R.T. Roush, B.E. Tabashnik. L.: Chapman and Hall, 1990.

Zhang J., Goyer C., Pelletier Y. Environmental stresses induce the expression of putative glycine-rich insect cuticular protein genes in adult *Leptinotarsa decemlineata* (Say). Insect Mol. Biol. 2008;17(3): 209-216.

Zhu Y.K., Lee S.H., Clark J.M. A point mutation of acetylcholinesterase associated with azinphosmethyl resistance and reduced fitness in Colorado potato beetle. Pest. Biochem. Physiol. 1996;55:100-108.

Zichova T., Kocourek F., Salava J., Nad'ová K., Stará J. Detection of organophosphate and pyrethroid resistance alleles in Czech *Leptinotarsa decemlineata* (Coleoptera: Chrysomelidae) populations by molecular methods. Pest. Man. Sci. 2010;66:853-860.